

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **63-005026**(43)Date of publication of application : **11.01.1988**

(51)Int.Cl.

**A61K 35/12**(21)Application number : **61-148130**(71)Applicant : **KOKEN KK**(22)Date of filing : **26.06.1986**(72)Inventor : **IJIMA KUNIHITO  
KATO HARUKI  
SAKAI YOSHIJIRO  
TAKEDA ATSUSHI  
NAGANUSHI YUICHIROU****(54) AGENT FOR SUPPRESSING GROWTH OF MALIGNANT TUMOR CELL OF ANIMAL****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain the titled agent having high suppressing effect in high purity, by culturing and proliferating a malignant tumor cell of an animal, culturing the cell in an extraction medium, removing the malignant tumor cell from the cultured liquid, eluting the liquid with a specific column and collecting a fraction eluted at a specific time.

**CONSTITUTION:** A malignant tumor cell of an animal including human (e.g. established cell strain H.R.C originated from human nephrocyte cancer cell) is cultured and proliferated, transplanted to a medium for extraction (e.g. serumfree medium) and cultured at 35W37°C for 4W7 days. The proliferated malignant tumor cell is removed from the medium to obtain a cultured liquid for extraction. The crude product is dissolved in methanol of an amount of 1/25 of the stock liquid and the supernatant liquid is eluted with a column filled with a fixed phase of 10cm in diameter and 120cm long and composed of hydroxypropylated dextran gel bead at a flow rate of 800ml/hr. The fractions eluted in 7.25W9.0hr and 11.875W13.094hr are collected to obtain the objective agent for suppressing the proliferation of malignant tumor cell.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-29933

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)4月5日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 35/12

// C 0 7 G 17/00

識別記号

ADU

庁内整理番号

7431-4C

F I

技術表示箇所

Z

発明の数1(全 4 頁)

(21) 出願番号 特願昭61-148130

(22) 出願日 昭和61年(1986)6月26日

(65) 公開番号 特開昭63-5026

(43) 公開日 昭和63年(1988)1月11日

(71) 出願人 999999999

興研株式会社

東京都千代田区四番町7

(72) 発明者 飯島 邦仁

東京都千代田区四番町7 興研株式会社内

(72) 発明者 加藤 陽樹

東京都千代田区四番町7 興研株式会社内

(72) 発明者 酒井 義次郎

東京都千代田区四番町7 興研株式会社内

(72) 発明者 武田 篤

神奈川県横浜市緑区霧が丘1-8-203

(72) 発明者 長主 陽一朗

神奈川県大和市中央3丁目9番4号

(74) 代理人 弁理士 竹本 松司 (外2名)

審査官 塚中 直子

(54) 【発明の名称】 動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 人を含む動物の悪性腫瘍細胞を培養増殖した後、抽出用培地に移して35~37℃で培養し、前記悪性腫瘍細胞を除いたものを、メタノールで膨潤したビーズ状のハイドロキシプロピル化デキストランゲルよりなる固定相を直径10cm、長さ120cm充填したカラムで1時間800ミリリットルの流量で溶出し、7.25~9.0時間及び11.875~13.094時間の間に流出する区分を分取したものを総合したものよりなることを特徴とする人を含む動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は、人を含む動物の悪性腫瘍細胞抑制剤に関するものである。

従来技術

2

動物の悪性腫瘍細胞の培養後培地より前記悪性腫瘍細胞を除いて抽出したものからなる動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は特開昭59-33223号として提案されている。

発明が解決すべき問題点

本発明は前記従来技術によって得られた悪性腫瘍細胞増殖抑制剤よりも純粋で抑制効果の高い動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤を提供することを目的とするものである。

問題点を解決するための手段

10 本発明の人を含む動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞H・R・C、マウス由来の株化細胞LLC等の動物の悪性腫瘍細胞を10%牛胎児血清添加のE-MEM(イーグルスミニマムエッセンシャルメディアム)等の培地で培養し、その後無血清培地等の抽出用培地に移して35~37℃で4~7日培養し、それから前

記悪性腫瘍細胞を除くことにより、抽出培養液を得、この粗製品に原液の1/25量のメタノールを加えて溶解し、その上澄みをメタノールで膨潤したビーズ状のハイドロキシプロピル化デキストランゲル（米国ファルマシアファインケミカル社製LH-20）を直径10cm、長さ120cm充填したカラムで1時間800ミリリットルの流量を通しメタノールで溶出し、7.25～9.0時間及び11.875～13.094時間の間に流出する区分を分画したものを総合したものよりなることを特徴とする。

前記分取に際しての検出器としては254nmの波長に対する吸光度を計測する紫外線検出器を用いる。この分画は、数種のアミノ酸を主成分とし、糖質を含まず、NMR（核磁気共鳴吸収）、ガスクロマトグラフィーで乳酸様シグナルを示す物質の含量は微小である。

そして、分子量は1000以下であり、水との親和性が極めて高く、無機塩と結合し易く、水、メタノールに可溶であって、一般に有機溶剤に溶けにくい性状を有している。

また、沸騰水浴中に1時間置いた場合、PH2～10の範囲で常温中に一昼夜放置した場合およびプロナーゼ処理及びグリコシターゼ処理等に対してその活性は失われないものである。

#### 実施例

##### 1) 使用細胞

動物の悪性腫瘍細胞としてヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを使用した。

##### 2) 培養

成長用培地には10%牛胎児血清を添加したE-MEMに4g/のグルコースを添加したものをを用い、抽出用培地としては、血清無添加のE-MEMにグルコースを2～5g/添加したものをを使用した。

まず成長用培地を用い、培養器に飽和状態になるまで悪性腫瘍細胞を増殖し、その後無血清のE-MEM培地で洗って血清を除く。次に、これを抽出用培地に移して35℃～37℃で培養し、抽出培養液を得る。

##### 3) 精製法

まず、悪性腫瘍細胞を除去分離するため採取された抽出培養液を直径60mm、内容積250ml、ポリカーボネート製の蓋付分離容器に入れ遠心分離機にセットし毎分1万回転で10分間遠心分離し、その上澄みを採取し、さらにこれを減圧蒸発乾固して粗製品を得る。

その後、これに抽出培養液の1/25量のメタノールを加え、溶解して直径60mm、深さ100mm、内容積250mlでポリカーボネート製の蓋付分離容器に入れ遠心分離機にセットし遠心分離（1万回転、10分間）し、その上澄み液3分をメタノールで膨潤した米国ファルマシアファインケミカル社製LH-20よりなる固定相充填のカラム（直径10cm、長さ120cm）に通し、メタノールで800ml/hの流量速度で溶出する。

検出には254nmの波長に対する吸光度を計測する紫外線

検出器を使用し、図に示すように、7.25～9.0時間及び11.875～13.094時間に流出する区分を分取したものを総合して総合分画を得た。なお、チャートスピードは4cm/hourである。

次に、このようにして採取した分画を10mmHg、40℃で減圧蒸発乾固し、さらにこれを100倍濃度の濃縮水溶液とする。

#### 4) 検定

（イ）24穴培養皿に $2 \times 10^5$ 個/穴のヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを植え込み、実験群を10%牛胎児血清をE-MEMに混合したものを培地として各穴に1.5ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%湿度で培養する。1日おきに培地交換し、7日目に細胞数を計り増殖を調べた。

対照標準として新鮮培地で培養したヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCの数を100%とし、7.25～9.0時間に流出する分画及び11.875～13.094時間に流出する分画を原液に換算して10倍濃度としたものをそれぞれA<sub>1</sub>及びB<sub>1</sub>とし、5倍濃度としたものをそれぞれA<sub>2</sub>及びB<sub>2</sub>として新鮮培地に投与してその影響を検べた結果を第1表に示す。

第 1 表

	生存率%
対照標準	100
A <sub>1</sub>	15.04
A <sub>2</sub>	45.80
B <sub>1</sub>	0
B <sub>2</sub>	28.07

（ロ）マウスにC57BLを用い、このマウスにマウス肺癌細胞10<sup>6</sup>個を側背部皮下に移植し、7.25～9.0時間に流出する分画A<sub>3</sub>、11.875～13.094時間に流出する分画B<sub>3</sub>及びこれら分画の総合分画Cの50倍濃縮水溶液を1日2回0.25ml注射によって投与し、投与8日目の腫瘍の縦×横の大きさ及び投与12日目の解剖による腫瘍の重量を計測した。対照標準に対する計測値を第2表及び第4表に示す。

第 2 表

	投与8日目の腫瘍の縦×横mm	抑制率%
対照標準	195.5±36.8	—
分画 A <sub>3</sub>	156.1±35.5	20.1
分画 B <sub>3</sub>	128.2±41.0	34.4
分画 C	119.7±31.7	38.8

第 3 表

	投与12日目の腫瘍の重量g	抑制率%
対照標準	3.20±0.52	—
分画 A <sub>s</sub>	2.32±0.63	27.50
分画 B <sub>s</sub>	2.47±0.67	22.81
分画 C	1.87±0.70	42.19

以上のように、7.25～9.0時間に流出する分画Aと11.875～13.094時間に流出する分画Bとは悪性腫瘍細胞抑制効果を異にしており、分画Bは増殖の初期抑制率が高く、分画Aは増殖途上における抑制力が高い。動物実験において、この両者を混合した分画を投与することにより、より高く、安定した抑制効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

図は、本発明の動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の分画抽出を示す線図である。

